EXIGÊNCIA DE HISTIDINA DE TILÁPIAS DE NILO NA TERMINAÇÃO (250 A 850G) COM BASE NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM O CRESCIMENTO MUSCULAR (MYOD E MIOGENINA) E DESEMPENHO PRODUTIVO

Dayane Cheritt Batista (PIBIC), Wilson Massamitu Furuya (Orientador), e-mail: wmfuruya@uepg.com.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Zootecnia

Ciências Agrárias, Zootecnia

Palavras-chave: Aminoácidos essenciais, expressão gênica, hiperplasia e hipertrofia.

Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de níveis crescentes de histidina digestível em dietas para juvenis de tilápias do Nilo com base no desempenho produtivo, morfometria das fibras musculares e expressão dos genes relacionados ao crescimento muscular (MyoD, miogenina e miostatina). Foram utilizados 288 juvenis de tilápia do Nilo distribuídos em 24 caixas, em delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e quatro repetições, de dietas com níveis crescentes de inclusão de histidina por um período de 65 dias. Os melhores resultados ($P<0,05$) de ganho em peso, conversão alimentar e taxa de eficiência proteica foram observados em peixes que receberam as dietas com 9,50 a 11,50 g kg^{-1} de histidina. Peixes que receberam dietas com 9,50 a 13,50 g kg^{-1} de histidina digestível apontaram maior expressão dos níveis de mRNA para o gene MyoD. A maior expressão dos níveis de mRNA para o gene miogenina, foi notada nos peixes nutridos com a dieta contendo 9,50 a 11,50 g kg^{-1} de histidina digestível. Conclui-se, que a exigência de histidina digestível para juvenis de tilápia do Nilo para o maior ganho em peso foi estimada em 10,0 g kg^{-1} similar a 3,7% da proteína da dieta.

Introdução

Dentre os nutrientes, a proteína é o componente principal e também o mais oneroso na formulação de dietas para animais aquáticos (Wilson, 2002). A deficiência de um único aminoácido na dieta pode limitar a utilização da proteína pelos peixes.

A histidina é considerada um aminoácido essencial e desempenha diversas funções biológicas e catalíticas vitais no organismo (Wu, 2013). O estudo sobre a expressão gênica é considerado promissor para o entendimento das respostas as diferentes condições nas quais os animais são submetidos, incluindo as mudanças ocasionadas por diferentes dietas fornecidas aos peixes (Sánchez-Vázquez et al., 2001). O objetivo do presente trabalho foi determinar as exigências de histidina digestível em dietas para juvenis de tilápia do Nilo com base no desempenho produtivo, bioquímicos, expressão dos genes relacionados ao crescimento muscular (MyoD, miogenina, miostatina) e morfometria muscular.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Aquicultura do Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura (GEMAq) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE – campus Toledo. Foram utilizados 288 juvenis de tilápia do Nilo, com

peso médio inicial 64,15±0,49g. Os peixes foram distribuídos em 24 caixas com capacidade de 500 litros, dotadas de um sistema de recirculação de água com um biofiltro, aeração e aquecimento constante. O delineamento foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro repetições, composto por 12 peixes. Os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados diariamente: temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutidade elétrica.

Foram elaboradas seis dietas experimentais com aproximadamente 267,3 kg^{-1} de proteína bruta e 4048 kcal kg^{-1} de energia bruta, contendo níveis crescentes de suplementação de L-histidina (Ajinomoto – Divisão de Nutrição Animal, SP, Brasil) de 0,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 g kg-1, onde foram obtidas dietas com 3,50; 5,50; 7,50; 9,50; 11,50 e 13,50 g kg^{-1} de histidina digestível (baseados nos valores propostos por Guimarães et al., 2008a; 2008b). O arraçoamento foi realizado quatro vezes ao dia (8h00, 11h00, 14h00 e 17h00) até a saciedade aparente. As análises foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC: High-Performance Liquid Chromatography) no Laboratório da Ajinomoto do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda. – Animal Nutrition, São Paulo, Brasil.

Após o período experimental de 65 dias, os peixes foram mantidos em jejum, posteriormente os animais foram insensibilizados em benzocaína (100 mg L^{-1}), seguindo o protocolo de (Gomes et al., 2001), para realização das medidas individuais de peso. Três animais de cada unidade experimental foram eutanasiados na dose de 250 mg L^{-1} (Gomes et al., 2001) para retirada do fígado.

Para o desempenho produtivo os seguintes parâmetros foram avaliados para todos os animais: o peso final médio (g); ganho em peso (peso corporal final – peso corporal inicial); conversão alimentar aparente (dieta consumida/ganho em peso); taxa de eficiência proteica (ganho de peso/proteína consumida); sobrevivência (100(número de peixes final/número de peixes inicial)) e índice hepatossomático (100 (peso fígado, g) / (peso corporal final, g)).

Para a coleta do tecido muscular, três exemplares de cada caixa foram capturados e eutanasiados em benzocaína 250 mg L-1, posteriormente, foi retirada uma amostra do músculo branco do lado esquerdo do peixe, abaixo da nadadeira dorsal e acima da linha lateral. As amostras passaram pelo processo de inclusão em parafina e posteriormente foram realizados os cortes dos blocos de parafina em com lâmina de vidro, sendo então submetidas à técnica de coloração hematoxilina e eosina (HE) e observadas em microscópio óptico (400x). Para a morfometria das imagens digitalizadas e foi determinado o menor diâmetro de 200 fibras musculares, por animal, que foram agrupadas em classes de diâmetros (< 20 µm, 20-50 µm e > 50 µm) para avaliar a contribuição da hiperplasia e hipertrofia para o crescimento muscular (Almeida et al., 2008).

As análises de expressão gênica foram realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural, Molecular e Genética da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa – PR. Foram coletados fragmentos da musculatura branca dorsal dos mesmos peixes utilizados para análise de fibra muscular. As amostras foram dissecadas, congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer – 80 ºC até o processamento. As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas, utilizando-se as condições de termociclagem: 95 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Ao término de cada reação, a amplificação específica de cada gene foi confirmada pela análise da curva de dissociação dos fragmentos amplificados.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando foram observadas diferenças significativas, aplicou-se teste de Tukey, ao nível de 5% de

significância. Para verificação dos dados das fibras musculares foi aplicada a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis. Para a determinação da exigência da histidina foi aplicada a análise de regressão polimomial de segunda ordem. As análises foram efetuadas por meio do programa computacional Statistic 7.1 (Statsoft, 2005).

Resultados e Discussão

Não foram observadas diferenças (P>0,05) para a composição corporal dos peixes para os parâmetros de umidade, proteína bruta, extrato etéreo e matéria mineral. Foram observadas diferenças significativas (P<0,05) para as variáveis de ganho em peso, conversão alimentar e taxa de eficiência protéica (Tabela 1). Contudo, o consumo das dietas contendo histidina não influenciou (P>0,05) o parâmetro de sobrevivência.

Tabela 1. Desempenho produtivo de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de histidina (g kg^{-1} da matéria seca)

	Níveis de histidina digestível (g kg^{-1})						
Variáveis	3,50	5,50	7,50	9,50	11,50	13,50	P
Peso inicial (g)	63,9±0,25	64,0±0,46	64,1±0,49	64,2±0,63	64,0±0,33	64,4±0,83	0,8146
Ganho em peso (g)	123,5 ±7,64^{d}	129,5± 8,13^{cd}	136,4± 2,95^{bcd}	163,6± 4,68^{ab}	170,9±10,09^{a}	154,07±0,25^{bc}	0,0002
Conversão alimentar	1,2±0,10^{b}	1,1±0,9^{b}	1,1± 0,4^{ab}	1,0± 0,3^{a}	1,0 ±0,1^{a}	1,0±0,2^{ab}	0,0008
Taxa de eficiência proteica	1,9±0,09^{b}	2,0±0,12^{b}	2,1±0,04^{ab}	2,5±0,08^{a}	2,6±0,17^{a}	2,3±0,26^{ab}	0,000940
Sobrevivência (%)	97,9±4,8	95,8±4,8	97,9±4,8	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	0,3489
	Equação						P
Ganho em peso	$Y= - 0,8424x^2 + 17,701x + 65,115$; $R^2 = 0,75$: His = 10,5 g kg^{-1}						0,001

[1]Valores são médias ± desvio padrão de quatro repetições. Médias na mesma linha com letras diferentes diferem pelo teste de Tukey (P>0,05).

Os níveis dietéticos de histidina não influenciaram (P>0,05) a frequência da ocorrência de fibras musculares brancas entre os tratamentos. A expressão dos níveis de mRNA da MyoD, miogenina e miostatina foram influenciados (P<0,05) pelos níveis de histidina digestível no músculo branco. A suplementação de 9,50 a 13,50 g kg^{-1} de histidina digestível proporcionou maior expressão (P<0,05) dos níveis de mRNA da MyoD, quando comparada com os tratamentos contendo 3,50, 7,50 e 9,50 g kg-1 de histidina digestível. A maior expressão dos níveis de mRNA da miogenina foi observada para os peixes que receberam as dietas contendo 9,50 e 11,50 g kg-1 de histidina digestível, quando comparada com os animais que receberam dietas com 3,50, 7,50 e 13,50 g kg-1, porém, não diferindo dos peixes que receberam a dieta com 7,50 g kg-1 de histidina digestível. A menor expressão (P<0,05) dos níveis de mRNA da miostatina foi observada em peixes que receberam a dieta contendo 11,50 e 13,50 g kg-1 de histidina digestível, enquanto que a maior expressão (P<0,05) dos níveis de mRNA da miostatina ocorreu peixes alimentados com a dieta contendo 3,50 a 9,50 g kg-1 de histidina digestível.

Uma melhora na conversão alimentar e na taxa de eficiência proteica (P<0,05) foi observada com o aumento nos níveis de histidina nas dietas. A pior

conversão alimentar e taxa de eficiência proteica foi observada em peixes que receberam a dieta que não foi suplementada com histidina.

A maior expressão dos níveis de mRNA da Myod foram observadas nos peixes que receberam a dieta contendo os maiores níveis de histidina digestível (9,50; 11,50 e 13,50 g kg-1) em comparação com peixes alimentados com a dieta sem suplementação de histidina. Assim como a MyoD, a maior expressão dos níveis de mRNA da miogenina foi observada nos peixes que receberam as maiores inclusões de histidina digestível (9,50 e 11,50 g kg-1). No entanto, peixes que receberam a dieta suplementada com 13,50 g kg-1 de histidina apresentaram menor expressão dos níveis de mRNA de miogenina, ocorrendo o mesmo para peixes que receberam os menores níveis de histidina digestível (3,50 e 5,50 g kg-1). Pode-se inferir que a histidina pode modificar a expressão dos genes MyoD e miogenina.

Foi observado que a suplementação de histidina influenciou o ganho em peso, a conversão alimentar, taxa de eficiência proteica, expressão dos genes relacionados ao crescimento muscular (MyoD, miogenina e miostatina).

Conclusões

Foi observado que a suplementação de histidina influenciou o ganho em peso, a conversão alimentar, taxa de eficiência proteica, expressão dos genes relacionados ao crescimento muscular (MyoD, miogenina e miostatina). A partir do ajuste dos dados ao modelo de regressão polinomial de segunda ordem a exigência de histidina digestível para o máximo ganho em peso foi estimada em 10,5 g kg-1 correspondente a 3,7 % da proteína.

Agradecimentos

Ao Cnpq pela bolsa concedida e à Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Referências

Almeida, F.L.A., et al. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus)* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. **Micron.** 39, 1306-1311, 2008.

Gomes LC, et al. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum)*. **J. World. Aquacult. Soc.** 32, 426-431, 2001.

Guimarães, I.G., et al. Nutrient Digestibility of cereal Grain Products and By-products in extruded diets for Nile tilapia. **J.World. Aquacult. Soc.** 39, 781-789. 2008 a.

Guimarães, I.G., et al. Amino acid availability and protein digestibility of several protein sources for Nile tilapia, Oreochromis niloticus. **Aquac. Nut.** 14, 396-404, 2008 b.

Sánchez-Vázquez, F.J., et al. Differential Effects of Meal Size and Food Energy Density on Feeding Entrainment in Goldfish. **J B R** 16, 58-65, 2001.

Wilson, R. P. Amino acids and proteins, in: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), **Fish Nutrition. Academic Press**. New York, pp. 143-179, 2002.

Wu. G. **Amino Acids: Biochemistry and Nutrition**. CRC Press Boca Raton, London New York, 482p, 2013.